

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE PATERNIDADE EM PROGÊNIES DE *Paspalum L.* VIA
MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES**

LUCAS HENRIQUE BATISTA NICOLINO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

ITUIUTABA – MG
NOVEMBRO – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE PATERNIDADE EM PROGÊNIES DE *Paspalum L.* VIA
MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES**

LUCAS HENRIQUE BATISTA NICOLINO

LUCAS MATHEUS DA ROCHA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

ITUIUTABA – MG
NOVEMBRO – 2019

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela paciência e proteção; à minha mãe pelo constante apoio psicológico e financeiro; a minha república, casa e família; a instituição de ensino por fornecer em forma de estrutura de ensino, abrigo e saber; a Embrapa pela experiência e estágio. Agradeço também todos os funcionários e professores pelo excelente trabalho desenvolvido, principalmente ao meu orientador pelos ensinamentos através de aulas, práticas de campo e conversa fiada.

Sumário

Introdução.....	6
Material e métodos	7
Material	7
Extração de DNA	8
Quantificação, verificação de qualidade e diluição dos DNAs	8
PCR – (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	9
Confirmação de amplificação.....	9
Eletroforese em Gel de Acrilamida	10
Materiais.....	10
Genotipagem	12
Resultados	12
Figura 1	13
Figura 2	13
Figura 3	13
Figura 4	14
Figura 5	14
Figura 6	14
Figura 7	15
Discussão.....	15
Conclusão	15
Tabelas	16
Referências:	20
Anexo	21

Resumo

Pertencente à família das Gramíneas, o gênero *Paspalum* L. possui mais de 350 espécies, sendo que muitas delas possuem grande potencial forrageiro. A Embrapa Pecuária Sudeste realiza pesquisas com o gênero, sendo que a maioria das espécies pertence ao grupo informal Plicatula. A maior parte desse grupo é tetraploide apomítico ($2n=4x=40$), sendo difícil encontrar diploides sexuais. A Embrapa, em seu programa de melhoramento genético poliploidizou genótipos diploides sexuais (BGP 281 – *P. lenticulare*; BGP 272 – *P. rojasii* e BGP 380 – *P. compressifolium*) que foram plantados a campo para produção de sementes possivelmente híbridas, pois é comum a observação de autoincompatibilidade em genótipos sexuais desse grupo. O presente trabalho teve por objetivo reconhecer as progênes híbridas dos cruzamentos entre os três acessos, a partir da identificação de paternidade via marcadores moleculares microssatélites. Foram utilizados oito marcadores microssatélites conhecidos da literatura, obtendo-se resultados de seis marcadores. Foram coletadas 44 amostras de progênes, mais três amostras dos genitores. Foi possível identificar 36 progênes híbridas dentre todas as amostras, sendo a maioria do cruzamento entre os acessos BGP (380) e BGP (281).

Palavras-chave: *Paspalum*, Plicatula, marcadores moleculares, paternidade, eletroforese.

Introdução

O Brasil possui uma grande produção de carne e leite, com mais de 170 milhões de bovinos sendo 95% da produção em regime de pastejo (Censoagro 2017). Consolidou-se como o maior exportador de carne bovina do mundo em 2018 segundo a Abiec (Associação Brasileira de Exportação de Carne). As gramíneas forrageiras são as principais fontes de nutrientes para os animais. No entanto grande parte do material genético forrageiro utilizado em pastagens é exótica no Brasil e pertence a poucos cultivares, tornando-os vulneráveis diante fatores bióticos e abióticos (Araújo Filho 2015). Para evitar este cenário há possibilidade de uso de espécies nativas mais adaptadas ao ambiente (Haker et al. 1974). Encontrado em diversas áreas do território nacional, o gênero *Paspalum* L. ocorre nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Oliveira & Valls 2008), apresentando, portanto, grande dispersão geográfica. O gênero *Paspalum* L. pertence à família *Poaceae* e, inclui aproximadamente 350 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. A maioria das espécies é nativa da América do Sul (Zuloaga & Morrone 2005) incluindo 214 espécies de origem brasileira segundo informações do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Oliveira & Valls 2015). O grupo Plicatula é uma categoria botânica informal estabelecida por Chase em 1929 a qual representa todas as espécies de capim do gênero *Paspalum* L. com semelhança morfológica à espécie *Paspalum plicatulum* Michx. Esse grupo dispõe de espiguetas com convexidade geralmente pronunciada, antécio superior castanho escuro e brilhante e ondulações transversais no lema inferior (Chase, 1929).

O Banco de Germoplasma de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste possui espécies de vários grupos, porém o predominante é o grupo Plicatula, sendo a maior coleção de acessos. O grupo é de ampla matriz taxonômica (Giussani et al. 2009), exibindo diferentes níveis de ploidia, sistema genético e modos de reprodução. Os indivíduos diploides ($2n = 2x = 20$) reproduzem-se sexualmente, enquanto os tetraploides ($2n = 4x = 40$) são apomíticos (Quarín 1992; Ortiz et al. 2013). O método de reprodução que prevalece no grupo é o apomítico. De rara ocorrência, o germoplasma sexual possibilita o melhoramento dos acessos tetraploides apomíticos pelo cruzamento entre o sexual e o apomítico, mas isso depende da duplicação dos cromossomos do acesso diploide. A poliploidização é um importante mecanismo de adaptação e especiação nas plantas (Ramsey & Schemske 1998). A obtenção de poliploides artificiais ou sintéticos pode ser feita via sexual, por meio da fecundação de plantas produtoras de gametas não reduzidos naturalmente (Parrot & Smith 1984); e também por tratamento com

colchicina (Quesenberry et al. 2010) ou outros anti-mitóticos químicos. A Embrapa tem utilizado no Programa de Melhoramento Genético de *Paspalum* a poliploidização pelo tratamento com colchicina. A planta apomítica quando realiza reprodução assexuada produz sementes, com constituição genética idêntica à planta mãe (Nogler 1984). O embrião se desenvolve de modo autônomo, sem fecundação. De modo que o embrião contenha exclusivamente os cromossomos somáticos maternos. Em plantas sexuais, após a meiose a célula mãe do megásporo dá origem ao megagametófito, saco embrionário que será fecundado. As pesquisas de plantas naturalmente apomíticas permitiram o controle de clonagem por sementes. Nessa perspectiva a Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos (SP), tem realizado pesquisas com melhoramento genético a partir de acessos diplóides sexuais de *Paspalum* do grupo Plicatula (BGP 281 *P. lenticulare*; BGP 272 *P. rojasii*; BGP 380 *P. compressifolium*). Estes acessos foram colocados a campo para cruzamento entre si buscando a produção de sementes, dado que foi observado autoincompatibilidade nos três materiais. Sementes foram coletadas de cada acesso, as quais foram tratadas com colchicina em diferentes concentrações a fim de obter plantas tetraploides sexuais do grupo Plicatula. Uma das formas de identificar a paternidade das progênes é utilizar marcadores moleculares. O intuito do trabalho foi identificar paternidade via uso de marcadores moleculares microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeat*) em progênes de *Paspalum* oriundas do cruzamento entre as espécies *P. lenticulare*, *P. rojasii* e *P. compressifolium*.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal e em casa de Vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste localizado em São Carlos, São Paulo.

Material

Foram avaliados os três genitores do cruzamento BGP 281 – *P.lenticulare*; BGP 272- *P. rojasii*; BGP 380- *P.compressifolium*, conservados a campo, e 44 indivíduos das três progênes conservadas em vasos em casa de vegetação (Tabela 1).

Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada pelo método brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) descrito por Doyle & Doyle em 1987, mas com algumas modificações, a partir de adequações às espécies em estudo. Para tanto, coletou-se cerca de 300 a 400 mg de folha das progênies. As folhas foram maceradas com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana, até que as amostras estivessem pulverizadas, esse passo é importante para o rompimento das paredes e membranas celulares do material. O conteúdo foi vertido, ainda líquido, em microtubos de 1,5 ml. Foi adicionado, a seguir, 500 µL do tampão de extração detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB 2%+β-mercaptoetanol 2% - Tabela 8) e 10 µL de β-mercaptoetanol em cada microtubo contendo amostra em preparação. Depois de bem misturado no vortex, centrifugado a 6000 rpm por um minuto, e banho maria a 65 °C por 40 minutos, as amostras foram tratadas com adição de 250 µL de SEVAG (Clorofórmio: Álcool Isoamílico 24:1). O sobrenadante (~400 µL) foi transferido para um novo microtubo identificado havendo adição de 400 µL de 2-Propanol gelado e 400 µL de álcool 70%. Na sequência, o microtubo passou por centrifugação de 6000 rpm por 20 minutos, e havendo novo descarte de sobrenadante, restando apenas o material desejado no microtubo que foi mantido em banho seco (50°) até completa secagem. A amostra foi então ressuspensa em 100 µL de água deionizada. Após esse procedimento, adicionou-se um µL de RNase (100 µg/ml) por amostra, foram incubadas por 30 minutos a 37°C sob agitação a 450 RPM e então armazenadas em geladeira.

Quantificação, verificação de qualidade e diluição dos DNAs

A quantificação foi feita de acordo com protocolo padrão para ácidos nucleicos do espectrofotômetro. Utilizando o programa NanoDrop ND-1000 V3.5.2, fez-se a estimativa da concentração dos ácidos nucleicos presentes em cada amostra com a aplicação de 1,2 à 2 µL de amostra no pedestal do aparelho o qual informa a concentração do ácido nucleico em ng/µl e as razões entre as absorbâncias 260/280 e 260/230. O procedimento se baseia no fato das proteínas absorverem luz no comprimento de onda de 280 nm (nanômetro vale $1,0 \times 10^{-9}$ metros) e ácidos nucleicos em 260 nm. Sendo assim, a relação 260/280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminações por proteína (Tabela 2). Os DNAs dos genitores já estavam extraídos, mas foram diluídos juntamente com os DNAs das progênies (Tabela 1) em uma

microplaca com a disposição adequada para a aplicação das amostras nos géis de eletroforese com micropipeta multicanal (Tabela 3).

PCR – (*Polymerase Chain Reaction*)

A Reação em Cadeia da Polimerase, que será designada pela sigla inglesa PCR, é um método que foi desenvolvido por Kary Mullis em 1980 e consiste na multiplicação de um trecho específico do DNA, delimitado por dois iniciadores (primers) que são complementares aos dois sítios de nucleotídeos presentes em cada fita do DNA. Os primers são compostos de 20 nucleotídeos, em média. Cada marcador possui sua extensão de bases de nucleotídeos específica. Além dos tipos de marcadores moleculares existentes, neste trabalho foram utilizados os marcadores SSR, também conhecidos como microssatélites, e são baseados na PCR. Esses marcadores moleculares são poderosas ferramentas para os testes de paternidade. Os produtos resultantes da amplificação por PCR podem ser separados e visualizados por eletroforese (Ferreira & Grattapaglia 1996). O protocolo de amplificação utilizado está descrito na Tabela 4, e está de acordo com Cidade et al (2009). Os marcadores microssatélites foram selecionados da literatura com base na espécie para a qual ele foi desenvolvido. A solução para a PCR foi preparada em microtubo contendo 2,1 µL de H₂O destilada; 7,5 µL de Mastermix; 1,2 µL de primer Forward e 1,2 µL de primer Reverse. Foi aplicado na placa 12 µL da solução e 3 µL de DNA de cada amostra totalizando 15 µL de volume final. A placa foi então introduzida no termociclador para ocorrer a reação polimerase em cadeia conforme protocolo descrito na Tabela 5.

Confirmação de amplificação

As amostras do DNA após terem seus trechos específicos do marcador multiplicados na PCR devem passar por eletroforese em gel de agarose para averiguar amplificação. A técnica de eletroforese separa as moléculas por migração de partículas no gel enquanto há uma aplicação de diferença de potencial elétrico. A molécula de DNA possui carga negativa e enquanto imersa no gel submetida à diferença de potencial tende a migrar para polo positivo. A escolha da cuba de eletroforese foi de acordo com o número de amostras a serem aplicadas no gel. Foram aplicadas no gel as reações de PCR de cada marcador, ou seja, para as 44 progênes mais os três genitores em cada extremidade da aplicação, totalizando 50 amostras. A concentração do gel se baseia na relação Peso/Volume (P/V), sendo a concentração utilizada

de 1% agarose em solução tampão TBE (Tris-borato-EDTA). Na preparação do gel há adição de 1 µl de brometo de etídeo (5 mg/ml) para cada 10 mL de Gel para visualização dos fragmentos após exposição sob luz ultravioleta. Para aumentar a densidade das amostras e colori-las, adicionou-se 3 µL de tampão de corrida 6x (Loading Buffer) nas alíquotas de 3 µL de PCR antes de serem aplicadas no gel, de modo que o tampão ficasse na proporção de uma parte de tampão para 5 de amostra. As amostras foram aplicadas nos poços do gel formados pelo pente, mais o ladder de 50 bp (Ludwig) nas extremidades. O ladder foi o indicativo dos tamanhos, em pares de bases (pb). Após a cuba ser fechada e os eletrodos conectados, aplicou-se uma voltagem de 5 Volts/cm do Gel. A corrida é monitorada a partir da migração do corante “azul de bromofenol” presente no tampão de corrida. Com o término da corrida, o gel foi retirado da cuba e colocado no centro da mesa do Fotodocumentador Bio-Rad. O gel foi exposto sob luz ultravioleta e fotografado, sendo que a imagem resultante do equipamento revela se a amplificação do fragmento de DNA esperado pela PCR teve êxito. Com o resultado positivo da amplificação no gel de agarose, a amostra de DNA fragmentada e amplificada pode passar para o próximo processo, a eletroforese em gel de acrilamida.

Eletroforese em Gel de Acrilamida

O procedimento descrito abaixo é protocolo do analista da Embrapa, Wilson Malagó Júnior.

Materiais

ACRILAMIDA 6% (1 l)

Uréia ultra-pura	420 g
Acrilamida 40%	150 mL
TBE 5X	200 mL
H ₂ O milli-q	Para completar 1L

PERSULFATO DE AMÔNIO (1 ml)

Persulfato de Amônio	0,1 g
H ₂ O milli-q	1 mL

TBE 5x (2 l)

Tris	108 g
Ácido bórico	55 g

Edta	7,3 g
H2O milli-q	Para completar 1L

FORMAMIDA (10 ml)

Formamida (Merck)	9,8 mL
Solução de EDTA 0,5M	125 µL

Ladder 10pb a 1 µg/µL (Invitrogen Cód. 10821-015)

Ladder	10 µL
Água deionizada	15 µL
Formamida	25 µL

Esse procedimento é realizado para separar os fragmentos amplificados de forma sensível, permitindo visualizar os alelos do loco. As amostras de PCR passam por um processo de eletroforese vertical em gel de acrilamida juntamente com ladder 10 pb (Invitrogen). O gel é montado entre duas placas de vidro, uma delas contendo solução de Bind (50 µL ácido acético glacial; 950 µL álcool etílico; Bind 3,5 µL), onde o gel se fixará, e a outra placa contendo REPEL (hidro-repelente). Quando as placas de vidro estão secas e montadas com os espaçadores de 0,4 mm, a solução de acrilamida 6% recebe TEMED e persulfato de amônio, para sua polimerização, sendo aplicado entre as placas até preencher completamente. Logo após a polimerização, as placas de vidro com gel foram instaladas na cuba de eletroforese vertical (marca C.B.S.), com pente dente de tubarão (Bio-Rad) formando poços para aplicação das amostras. A cuba foi preenchida com solução tampão TBE 1x, os cabos da fonte foram conectados, sendo o positivo inferior e o negativo superior. Cada Gel é aquecido a uma constante de 80 watts por aproximadamente 40 minutos. Enquanto é aquecida, as amostras foram preparadas em microplaca contendo 3 µL de PCR; 3,5 µL de formamida; 3,5 µL de H₂O, e passam por 5 minutos à 94 °C no termociclador para desnaturação. Com as placas aquecidas fez-se a aplicação das amostras no Gel (1,5 µL), a corrida se inicia a uma constante de 60 watts por gel, e dura em média duas horas e meia, a depender do tamanho esperado dos fragmentos. Após a corrida de eletroforese, as placas de vidro com o gel são retiradas da cuba e separadas com uma espátula. A placa contendo REPEL foi lavada e a com BIND que contém o gel seguiu para o protocolo de coloração de gel por nitrato de prata (Creste et al 2002), que consiste em tratar o gel em uma sequência de soluções a fim de revelar os alelos.

Genotipagem

Na genotipagem através do gel de acrilamida é possível confirmar a paternidade de plantas oriundas de cruzamentos, ao identificar os alelos das progênies e compará-los aos alelos dos possíveis genitores masculinos. Dessa forma a paternidade de progênies de *Paspalum* foi identificada através de comparação dos alelos das progênies e dos genitores. O tamanho dos alelos foi estimado em comparação com o ladder 10 bp (Invitrogen), que apresenta bandas entre 100 bp e 330 bp separadas por 10 bp. As progênies foram consideradas híbridas quando apresentavam uma banda do possível genitor masculino que não estava presente no genitor feminino conhecido, indicado na Tabela 6. As bandas que são encontradas nas progênies, e não identificadas em nenhum genitor, indicam a ocorrência de indivíduos contaminantes. A contaminação pode ocorrer em alguns processos, como a mistura de sementes no momento do cultivar, e contaminação na tesoura de poda.

Resultados

Os DNAs totais das amostras foram extraídos e quantificados com sucesso (Tabela 2).

Foram realizadas a amplificação e eletroforese em gel de agarose para os oito marcadores descritos na Tabela 6, sendo um gel para cada marcador contendo as 50 amostras. Na eletroforese em gel de acrilamida houve algumas placas em que a corrida falhou devido ao excesso de ureia nos poços no momento da aplicação, que é liberada durante o aquecimento do gel nas placas de vidro, no entanto foram repetidas. O resultado positivo da quantificação, amplificação e eletroforese deram sequência ao trabalho de genotipagem, no qual foi possível identificar até 36 indivíduos híbridos.

Segundo a leitura da corrida do gel de poliacrilamida foi possível a identificação de indivíduos híbridos e de contaminantes, Tabela 7.

Em sequência as imagens dos géis de acrilamida corados com prata.

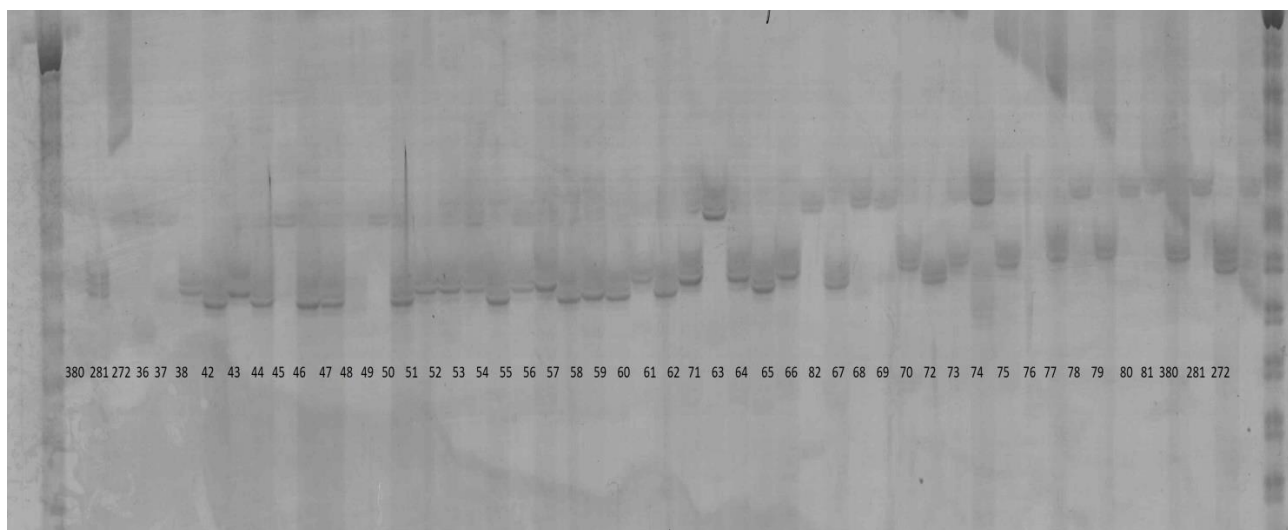


Figura 1. Marcador PA01B7

Plantas: 36 é contaminante; 37, 38, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 65, 66, 82, 67, 68, 69, 70, 72, 74, 76, 77, 78, 81 são híbridos.

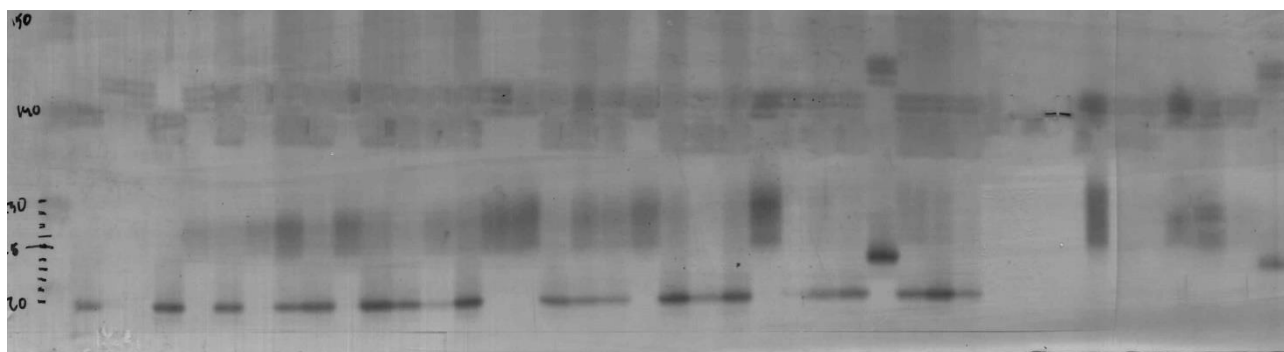


Figura 2. Marcador PA02A5 foto 1.

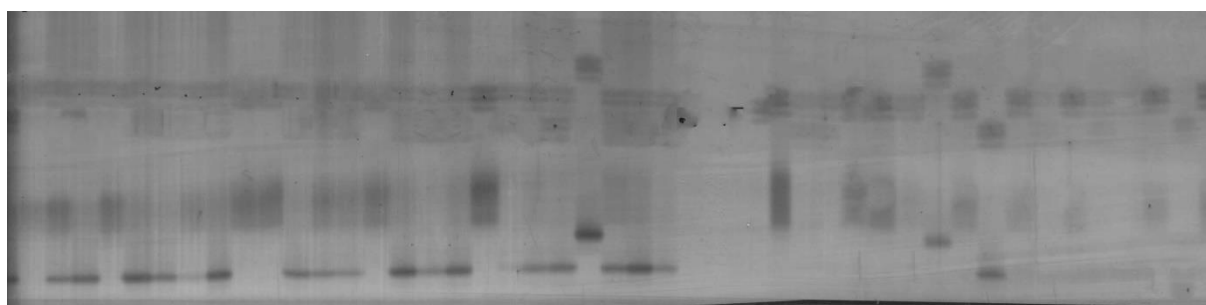


Figura 3. Marcador PA02A5 foto 2.

Plantas: 37, 38, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 71, 64, 65, 66 são híbridos

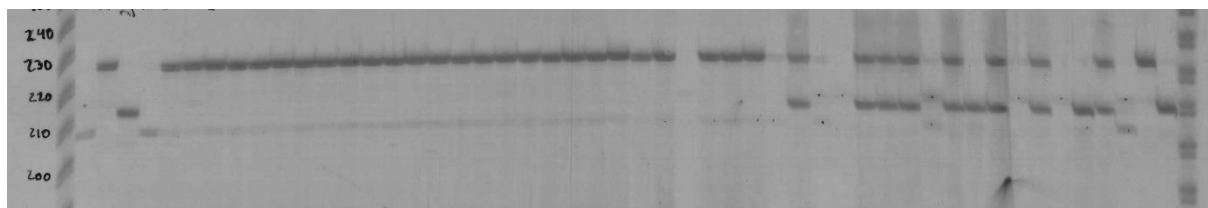


Figura 4. Marcador PN02A12.

Plantas: 36, 71, 67, 68, 73, 77, 79 são contaminantes; 37, 38, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 82, 67, 69, 70, 72, 74, 76, 78, 81 são híbridos.

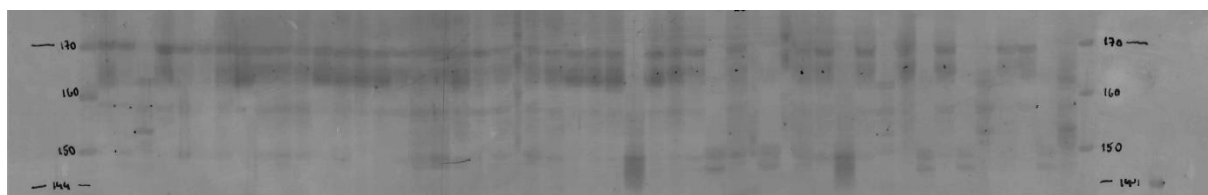


Figura 5. Marcador PpUnicamp 8.

Plantas: 71, 73, 75 são contaminantes; 37, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 70, 72, 74, 76, 77, 78, 79, 81 são híbridos.

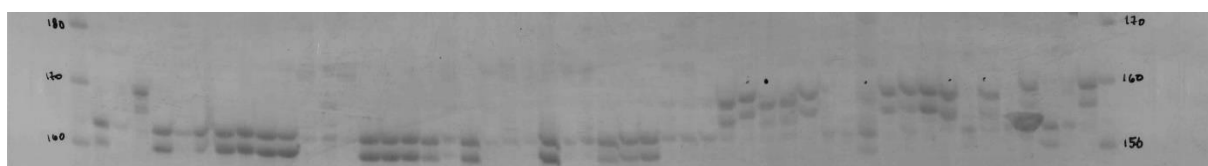


Figura 6. Marcador PpUnicamp 21.

Plantas: 66, 82 são híbridos.

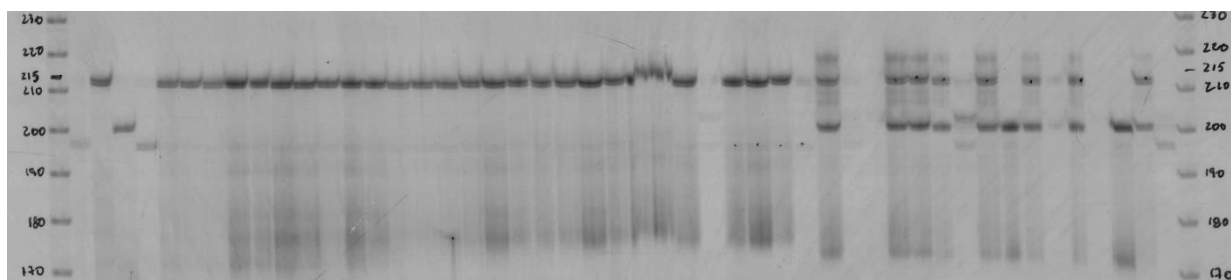


Figura 7. Marcador PpUnicamp 24.

Plantas: 71, 67, 73, 79 são contaminantes; 37, 38, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 69, 70, 72, 74, 76, 77, 78, 81 são híbridos.

Discussão

Os marcadores moleculares são bastante úteis em estudos de diversidade e mapeamento genético, pois não apenas são locos específicos, mas, também, geram grande número de alelos por loco, apresentam caráter codominante e possibilitam distinguir genótipos proximamente relacionados, o que permite maior eficiência e orientação em futuros cruzamentos, estudos genéticos e seleção assistida por marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O seu uso no grupo *Plicatula* teve início por Oliveira et al. 2016, com produção e teste de efetividade em *Paspalum L.*, e deu origem aos marcadores Pp-Unicamp utilizados neste trabalho. Existem outros marcadores moleculares como o ISSR (Inter Simple Sequence Repeat – Inter Repetições de Sequência Simples) que foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites sem a necessidade do conhecimento prévio do sequenciamento do DNA da espécie-alvo, como ocorre nos marcadores SSR (Zietkiewicz et al. 1994). O teste de paternidade, via marcadores microssatélites, identificou os híbridos que devem prosseguir no programa de melhoramento vegetal da Embrapa e demonstrou a efetividade dos seis marcadores SSR para as espécies-alvo.

Conclusão

O trabalho de identificação de paternidade em progênies de *Paspalum* com base em seis marcadores moleculares microssatélites possibilitou a caracterização de 36 indivíduos híbridos, aproximadamente 84% das 44 plantas submetidas ao experimento, e oito contaminantes que se misturaram às sementes da amostragem. Sendo a maioria das progênies descendentes do cruzamento entre *P.lenticulare* e *P.compressifolium* (27 indivíduos). Ainda que não sejam confirmados como tetraploides, as progênies híbridas identificadas representam material genético inédito e poderão ser incorporadas no programa de

melhoramento genético de *Paspalum* e/ou utilizadas para estudos genético-moleculares. Caso sejam tetraploides, configuram material inédito apto para cruzamentos em nível de tetraploide dentro do grupo Plicatula de *Paspalum* L.

Tabelas

Tabela 1

Planta	Genitor feminino BGP	Código da amostra	Concentração (Ng/ μ L)	Volume de DNA (μ L)	Volume de H ₂ O milliQ (μ l)
31	380	36	658,8	1,5	98,5
32	380	37	441,9	2,3	97,7
33	380	38	358,4	2,8	97,2
34	380	42	226,96	4,4	95,6
35	380	43	134,74	7,4	92,6
36	380	44	186,73	5,4	94,6
37	380	45	110,17	9,1	90,9
38	380	46	143,14	7,0	93,0
39	380	47	154,37	6,5	93,5
40	380	48	174,59	5,7	94,3
41	380	49	172,07	5,8	94,2
42	380	50	274,02	3,6	96,4
43	380	51	226,54	4,4	95,6
44	380	52	477,87	2,1	97,9
45	380	53	290,65	3,4	96,6
46	380	54	332,84	3,0	97,0
47	380	55	757,56	1,3	98,7
48	380	56	241,66	4,1	95,9
49	380	57	159,98	6,3	93,7
50	380	58	179,01	5,6	94,4
51	380	59	95,73	10,4	89,6
52	380	60	166,28	6,0	94,0
53	380	61	270,61	3,7	96,3
54	380	62	149,44	6,7	93,3
55	281	63	118,42	8,4	91,6
56	281	64	265,73	3,8	96,2
57	281	65	384,45	2,6	97,4
226	281	66	700,99	1,4	98,6
230	272	67	1012,7	1,0	99,0
232	272	68	178,47	5,6	94,4
233	272	69	570,82	1,8	98,2
240	272	70	547,77	1,8	98,2
286	380	71	573,78	1,7	98,3
287	272	72	872,25	1,1	98,9
266	272	73	831,14	1,2	98,8

270	272	74	849,01	1,2	98,8
281	272	75	772,00	1,3	98,7
282	272	76	909,43	1,1	08,9
272	272	77	713,58	1,4	98,6
285	272	78	678,74	1,5	98,5
255	272	79	912,04	1,1	98,9
271	272	80	851,58	1,2	98,8
267	272	81	678,67	1,5	98,5
247	281	82	934,08	1,1	98,9

Lista de material avaliado neste trabalho, com sua respectiva quantificação de ácidos nucleicos (Nanodrop) e cálculos de diluição para 10 Ng/ μ L.

Tabela 2

Planta	Código da amostra	260/280	260/230
31	36	1,98	1,73
32	37	1,95	1,75
33	38	1,89	1,36
34	42	1,89	1,58
35	43	1,94	1,29
36	44	1,81	1,03
37	45	1,83	1,30
38	46	1,81	1,31
39	47	1,87	1,35
40	48	1,92	1,58
41	49	1,86	1,38
42	50	1,94	1,70
43	51	1,92	1,68
44	52	1,93	1,80
45	53	1,85	1,79
46	54	1,88	1,45
47	55	1,86	1,39
48	56	1,86	1,45
49	57	1,81	1,48
50	58	1,80	1,18
51	59	1,82	1,04
52	60	1,92	1,17
53	61	2,23	1,64
54	62	2,04	0,35
55	63	1,89	0,56
56	64	1,80	1,43
57	65	2,08	1,27
226	66	2,07	1,70
230	67	2,10	1,89
232	68	2,09	1,66
233	69	2,04	2,00
240	70	2,06	2,02
286	71	2,03	1,90

287	72	2,12	2,10
266	73	2,08	1,91
270	74	2,10	2,00
281	75	2,15	2,15
282	76	2,10	1,99
272	77	2,16	2,04
285	78	2,24	2,22
255	79	2,19	2,12
271	80	2,14	2,02
267	81	2,17	2,03
247	82	2,18	2,01

Razões entre as absorbâncias.

Tabela 3

PLACA DNAs USO 10 ng/ul												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			14A	4A	52	53	82	67	4A	5A		
B			5A	36	54	55	68	69				
C			37	38	56	57	70	72				
D			42	43	58	59	73	74				
E			44	45	60	61	75	76				
F			46	47	62	71	77	78				
G			48	49	63	64	79	80				
H			50	51	65	66	81	14A				

Mapeamento da microplaca para micropipeta multicanal.

Tabela 4

Nome do Marcador	T°C amplificação	Tamanho esperado (pb)	Referência
PN02A12	60	185-205	Cidade et al. (2010)
PA01B7	60	239-279	
PA02A5	56	122-132	
PpUNICAMP 19	57	203-241	Cidade et al. (2010)
PpUNICAMP 8	51	144-170	
PpUNICAMP 21	55	145-205	
PpUNICAMP 11	60	232-266	
PpUNICAMP 24	60	179-215	

Marcadores SSR utilizados neste trabalho.

Tabela 5

Fases	Temperatura	Tempo/Repetições
1 fase	95°C	3 min
2 fase	95°C	30 seg

3 fase	X°C (específica para cada marcador)	30 seg
4 fase	72°C	1 min
5 fase	Voltar ao ciclo 2	34x
6 fase	72°C	5 min
7 fase	4°C	∞

Protocolo termociclador para amplificação dos microsatélites avaliado

Tabela 6

Marcador SSR	Nº alelos por marcador	380	281	272
PpUnicamp19	Marcador não informativo	-	-	-
PN02A12	3	1	1	1
PpUnicamp8	7	3	5	3
PpUnicamp24	3	1	1	1
PpUnicamp11	Marcador não informativo	-	-	-
PpUnicamp21	2	1	1	1
PA01B7	3	1	2	1
PA02A5	3	1	1	2

Resultados da amplificação dos marcadores microsatélites avaliados

Tabela 7.

Marcador	Híbridos	Contaminantes
PN02A12	32	6
PpUnicamp8	33	3
PpUnicamp24	35	4
PpUnicamp21	5	0
PA01B7	36	2
PA02A5	27	0
Todos os locos	36	8

Resultados da genotipagem dos SSR avaliados e respectiva quantidade de híbridos e contaminantes identificados.

Tabela 8

Componente	Sol. Estoque	Conc. Final	Para cada 100 ml
Tris HCl pH 8,0	1 M	100 mM	10 ml
NaCl	5M	700 mM	14 ml

EDTA pH 8,0	0,5 M	50 mM	10 ml
Água deionizada	-	-	66 ml
*CTAB	-	2 %	2 g
*Beta-mercaptoetanol	-	2 %	2 ml

Protocolo do Tampão de extração (CTAB 2%).

Referências:

1. https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75652
2. Oliveira, R.C. de, Valls, J.F.M. 2015. *Paspalum* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
3. Zuloaga FO, Morrone O. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monogr Syst Bot Mo Bot Gard. 2005;102:1–297.
4. Oliveira, R.C. de, Valls, J.F.M. 2015. *Paspalum* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
5. Chase, A. 1929. The North American species of *Paspalum*. Contr. U. S. Natl. Herb. 28:1–310.
6. Giussani LM, Zuloaga FO, Quarin CL, Costa-Sánchez JH, Ubayasena K, Morrone O (2009) Phylogenetic relationships in the genus *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). Systematic Botany 34, 32
7. Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American, 262(4), 56–65. doi:10.1038/scientificamerican0490-56.
8. Ramsey, J.; Schemske, D. W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics, Pala Alto, v. 29, p. 467-501, 1998.
9. Parrot, W.A.; Smith, R. R. Production of 2n pollen in red clover. Crop Science, Madison, v. 24, p. 469-472, 1984.
10. Quesenberry, K.H. et al. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. Euphytica, v.17, n.1, p.43-50(8), 2010.
11. Nogler, G.A. (1984) Gametophytic Apomixis. In: Johri, B.M. (ed.) Embryology of angiosperms.

12. Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15
13. Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. *Introdução ao uso de marcadores em análise genética*. 2-Ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.
14. Araújo Filho, J. A. *Revista Alimentação* v.15, n.6, p.10-11. 2015.
15. Cidade, F.W. et al. Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. *AJB Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences*, e107-e110, 2010.
16. Haker, J. B., Forbe, B. J. E Gow, J. M. Simulate frosting of tropical grasses. *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, v. 25, n.1, p.45-77, 1974.
17. Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p. (Embrapa-Cenargen. Documentos, 20).
18. Zietkiewicz, E. et al. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v.20, n.2, p176-83, 1994.

Anexo

Formatação de acordo com Brazilian Journal of Botany.

Manuscripts should be double-spaced throughout, with consecutive page numbering. Use Word for Windows 2000 (or later versions), font Times New Roman, size 12. Place only one space between words and do not hyphenate them at the end of a line. Do not use tabulation (Tab key) except at the beginning of each paragraph. Do not use bold or underline (except in subtitles). Restrict italics to scientific names, descriptions or diagnosis of new taxa, the names and numbers of collectors, and for genetic or statistical symbols.

Manuscript format

First page - Title: concise and informative (in bold); authors' full names (**in capital letters**); affiliation, complete address, corresponding author and respective e-mail, all as footnotes; running title.

Second page - ABSTRACT (include title), Key words (up to 5, in alphabetical order without repeating any title words).

Text - Start a new page each according to the following sequence of items: **INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, and REFERENCES.**

First-level headings - capitalize the first letter, bold, not centered.

Second-level headings- italic, bold, same font as the first-level heading, followed by the text on the same line but separated by dash (-).

Present references according to the following examples: Smith (1960) or (Smith 1960); Smith (1960, 1973); Smith (1960a, b); Smith & Gomez (1979) or (Smith & Gomez 1979); Smith et al. (1990) or (Smith et al. 1990); (Smith 1989, Liu & Barros 1993, Araujo et al. 1996, Sanches 1997). References to unpublished results or submitted papers should appear as follows: (SE Sanchez, unpublished data).

Provide numbers and units as follows:

- Separate units from values by placing a space (except for percentages, or geographical degrees, minutes and seconds); use abbreviations whenever possible.
- For compound units, use exponentiation, not slash (Example: mg day⁻¹ instead of mg/day, $\mu\text{mol min}^{-1}$ instead of $\mu\text{mol/min}$).

References

Adopt the format used in the examples as follows:

Zar JH. 1999. Biostatistical analysis. 4th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River.

Yen AC, Olmstead RG. 2000. Phylogenetic analysis of *Carex* (Cyperaceae): generic and subgeneric relationships based on chloroplast DNA. *In* Monocots: systematics and evolution (KL Wilson, DA Morrison, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, p.602-609.

Bentham G. 1862. Leguminosae. Dalbergiae. *In* Flora brasiliensis (CFP Martius, AG Eichler, eds.). F. Fleischer, Lipsiae, v.15, pars 1, p.1-349.

Döbereiner J. 1998. Função da fixação de nitrogênio em plantas não leguminosas e sua importância no ecossistema brasileiro. *In* Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros (S Watanabe, coord.). Aciesp, São Paulo, v.3, p.1-6.

Farrar JF, Pollock CJ, Gallagher JA. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154:1-11.

Cite dissertations or theses **only in exceptional cases**, when the information provided is essential for a better understanding of the paper, and when the information has not been published as a scientific paper. In this case, use the format below:

Sano PT. 1999. Revisão de *Actinocephalus* (Koern.) Sano - Eriocaulaceae. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Do not cite meeting abstracts.

Tables

Use Word for Windows design resources and table formatting.

Avoid abbreviations (except for units).

Tables should be placed on separate pages, with their titles positioned above them, according to the example:

Table 1. Total flavonoids and total phenol production (% of dry mass) in leaves of *Pyrostegia venusta*.

Do not insert vertical lines; use horizontal lines only .